ARCHIVIO

PER LE

SCIENZE MEDICHE

PUBBLICATO DA

G. BIZZOZERO (Torino) — C. BOZZOLO (Torino) — P. FOÀ (Torino)
C. GIACOMINI (Torino) — C. GOLGI (Pavia) — L. GRIFFINI (Modena)
N. MANFREDI (Pisa) — E. MARCHIAFAVA (Roma) — A. MOSSO (Torino)
L. PAGLIANI (Torino) — E. PERRONCITO (Torino) — G. SALVIOLI (Genova)
E. SERTOLI (Milano) — C. TARUFFI (Bologna) — G. TIZZONI (Bologna)

E DIRETTO DA

G. BIZZOZERO

S 314

Estratto

TORINO
ERMANNO LOESCHER
FIRENZE — ROMA
Via Tornabuoni, 20. — Via del Corso, 307.
1888

Omaggio dell'a

ARCHIVIO PER LE SCIENZE MEDICHE. — Vol. XII. N. 11.

Gabinetto di Fisiologia della R. Università di Modena.

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELLE CONDIZIONI CHE MANTENGONO INCOAGULABILE IL SANGUE CIRCOLANTE

STUDIO SPERIMENTALE

del Dottore **Ignazio SALVIOLI**
Assistente di Fisiologia.

La nozione che alcuni fermenti impediscono in modo simile al peptone la coagulazione del sangue, è un acquisto del tutto recente della scienza. Però noi sappiamo ancora ben poco sul meccanismo d'azione dei detti fermenti, poichè fino al presente su questo argomento, non è stata sufficientemente rivolta l'attenzione degli studiosi, benchè fuor di dubbio, si debbono ottenere dei risultati degni del massimo interesse. Infatti grazie a questo studio debbono progredir le nostre cognizioni sul processo della coagulazione, poi debbono aumentare le nostre conoscenze sul ricambio materiale, sulla nutrizione, insomma sulle proprietà vitali in generale degli elementi morfologici del sangue, studiati in rapporto col plasma sanguigno nel quale nuotano; ed in ultimo poi con questo studio potrà essere determinato se anche nelle condizioni normali i fermenti, che in tanta quantità vengono elaborati nell'organismo, siano destinati ad esercitare ulteriori speciali funzioni sul sangue e sui vasi, dopochè sono riassorbiti e sono passati nel circolo.

Su questo argomento nel corso di due anni ho intrapreso una abbastanza estesa serie di indagini, servendomi dei varii fermenti sia vegetali che animali, più conosciuti: così ho esperimentato colla diastasi, tanto vegetale che animale, preparata da me, oppure provveduta da alcuni laboratorii chimici, come quelli di Erba di Milano e Trommsdorff di Erfurt. Ho fatto indagini coll'emulsina, fermento solubile delle mandorle amare, tanto preparata da me, quanto acquistata dalla fabbrica di Trommsdorff, poi ancora colla mirosina, fermento solubile della senape nera preparata da me, poi ancora colla papaina, fermento dell'Acarica papaia, fermento peptico vegetale provvisto dalla casa Erba, ed infine ho sperimentato col fermento che sdoppia i grassi in acidi grassi e glicerina preparato da me col metodo di Danilewscky.

Tutti questi fermenti iniettati nel sangue in proporzioni all'incirca uguali lo rendono incoaguabile, vale a dire i saggi di sangue raccolti dopo l'iniezione restano liquidi sino alla loro decomposizione.

La conoscenza di questa proprietà dei fermenti fu per la prima volta dimostrata dall'Albertoni (1) coll'estratto glicerico peptico e pancreatico, benchè per quanto riguarda quest'ultimo estratto, non si potesse anzitutto al certo definire a quale dei tre fermenti elaborati dal pancreas dovesse attribuirsi l'azione in discorso. In seguito venne tale proprietà dimostrata dal Salvioli (2) per i fermenti diastasici sia animali che vegetali, ed ora io ho potuto notare che questa proprietà è generalizzabile a tutti i fermenti sia animali che vegetali.

Ciò che anzitutto voglio far rilevare si è il fatto che questi fermenti rendono il sangue incoagulabile solo allora quando hanno circolato nel sangue, e non mai quando vengono anche

---

(1) Albertoni, « Rendiconto delle ricerche fatte nel Laboratorio di Fisiologia di Siena nell'anno 1880 ».

(2) Salvioli, « Azione dei fermenti diastasici sulla coagulazione del sangue ». *Arch. per le Scienze Mediche*, 1885.

in maggior quantità mescolati col sangue raccolto nelle migliori condizioni all'infuori del circolo. Forse i risultati che ottenne il prof. Albertoni coll'estratto glicerico di pancreas, cioè l'avere egli osservato che il sangue mescolato con questo estratto non coagulava, poteva dipendere dall'azione della glicerina nella quale stava disciolto il fermento, la quale, come è noto dalle ricerche di Grünhagen, ha appunto azione di impedire o ritardare la coagulazione del sangue. Inoltre fa d'uopo tener presente che mescolando al sangue della pancreatina ed anche della papaina, dopo 24 ore si trova questo, liquido, però avendo seguìto tutte le fasi del fenomeno si può convincere che quello stato liquido del sangue dipende dalla digestione o dalla fluidificazione della fibrina provocata da questi fermenti, in quanto che pochi minuti dopo aver mescolato il sangue con questi, succede sempre la coagulazione.

Ma per non limitarmi al risultato, che cioè la semplice mescolanza di questi al di fuori dell'organismo è senza effetto, da alcune esperienze ho potuto rilevare che anche nell'interno dell'organismo, l'azione, ad es., dei fermenti diastasici, non si riduce ad una semplice mescolanza col sangue, ma fa d'uopo che i detti fermenti circolino per un dato periodo e agiscano sugli elementi morfologici del sangue o dei tessuti; e questo lo deduco appunto da alcuni esperimenti diverse volte ripetuti, e nei quali chiaramente appare che la semplice mescolanza fatta anche nell'interno dei vasi sanguigni è senza effetto.

Ecco a questo proposito un esempio delle esperienze istituite:

In un cane ho messo a nudo per largo tratto le vene giugulari, ho legato l'estremo centrale, ho lasciato che i vasi si facessero turgidi e con un'altra legatura nella parte superiore le ho isolate: con una siringa ho iniettato nel sangue stagnante di dette vene una soluzione forte di diastasi, e le ho lasciate quindi a sè, una per l'intervallo di 10 minuti, l'altra di mezz'ora. Il sangue raccolto in tubetti d'assaggio dopo questi due periodi coagulò ugualmente, benchè la proporzione di diastasi impiegata fosse di molto maggiore di quella che comunemente viene impiegata per le iniezioni nel sangue e colla quale si ottiene il sangue incoagulabile;

e come pure fosse maggiore il tempo di permanenza di detto fermento col sangue.

Voglio qui aggiungere ancora un esempio d'altri esperimenti, il quale serve sempre a dimostrare che l'azione dei fermenti non può dipendere al certo da una semplice mescolanza col sangue.

Nell'arto posteriore di un cane isolo l'arteria e la vena femorale, nell'arteria introduco un tubo a T in modo che il sangue continui a circolare per l'arto, mentre per la branca trasversale spingo con una siringa una soluzione di fermento; nella vena metto una canula onde raccogliere saggi di sangue. I saggi di sangue raccolti quando contemporaneamente si iniettava la diastasi e anche 7 od 8 minuti dopo che la diastasi era trattenuta nell'arto, sono coagulati. Però i saggi successivi a questo periodo di tempo andarono man mano perdendo la loro coagulabilità anche se presi da altri distretti vascolari, e questo fatto dipendeva da ciò, che per mezzo dei vasi collaterali era penetrato in tutto il sangue il fermento che si faceva circolare nell'arto.

Per questi esperimenti restano però sempre occulte le condizioni che determinano la produzione di questo fenomeno, vale a dire la perdita della coagulabilità del sangue.

Non vi ha dubbio che in prima linea debbono essere tenute presenti le condizioni degli animali sui quali si esperimenta; ma a questo proposito posso dire che il fenomeno si produce ugualmente nei cani digiuni o pasciuti; solo nei cani digiuni occorre una dose minore per ottenere l'incoagulabilità del sangue nel modo più accentuato; ho ancora notato che identico risultato si ottiene tanto in cani robusti quanto in cani deperiti per prolungate suppurazioni; ed infine ho osservato che ugualmente si produce nei cani da poco o da molto tempo smilzati.

Per ottenere delle cognizioni un po' meno incomplete sul modo d'agire di questi fermenti sarebbe fuor di dubbio necessario ricercare se questi fermenti persistono molto tempo nel sangue se vengono eliminati, oppure se subiscono delle modi-

ficazioni, e se la loro azione sulla coagulazione dipenda dalle modificazioni che hanno subito, od infine se portano modificazioni sulla nutrizione degli elementi morfologici del sangue. È un campo di ricerche fuor di dubbio molto difficile e che dovrebbe essere affrontato specialmente colla indagine chimica, ma io mi sono limitato per ora ad affrontarlo dal puro lato fisiologico mercè una serie di ricerche le quali mi hanno condotto fuor di dubbio ad alcune interessanti conclusioni nello studio della presente questione; ma mi hanno poi maggiormente dimostrato che una soluzione del problema non può ottenersi che continuandolo da un punto di vista specialmente chimico.

Così io, ad es., dopo l'iniezione dei fermenti non ho cercato colle manipolazioni chimiche di ricavarli nuovamente dal sangue, oppure non ho studiato di ricercare con queste indagini di scoprire dei corpi i quali mi dimostrassero la trasformazione di questi fermenti, per poscia conoscerne la loro azione e le loro proprietà, ma invece mi sono limitato, servendomi di alcune reazioni, o di affermare o di escludere la loro presenza, la durata della loro presenza, le condizioni della loro azione, la loro finale destinazione.

Ricercare, ad es., se i fermenti diastasici persistono ancora nel circolo e per quanto, se la quantità iniettata si è trasformata tutto od in parte ed in quanto tempo, quali sieno le modificazioni che hanno subìte, oppure se invece di essere trasformati sono stati eliminati, sono questioni certo del massimo interesse, ma molto difficili, nè mi sono quindi accinto con questi fermenti diastasici a risolvere questo quesito, perchè poi è noto che la proprietà diastasica è stata attribuita a molte sostanze albuminoidi: mi sono invece servito di un altro fermento il quale con più facilità si può scoprire, cioè dell'emulsina, perchè, come è noto, questo fermento ha quella reazione caratteristica di svolgere odore di mandorle amare quando sia posto in contatto coll'amigdalina glucoside delle mandorle.

Ecco una delle esperienze praticate con questa sostanza:

Ad un cane digiuno da due giorni, del peso di Kg. 4,900, inietto a due riprese, cioè con intervallo di 20 minuti, nella giugulare, grammi 2,60 di emulsina sciolta in 35 cc. di soluzione salina filtrata, corrispondente a 0,57 per 1000 del peso del corpo. Il sangue che prima coagulò 3 minuti dopo estratto, nei saggi presi successivamente alla seconda iniezione restarono liquidi. Essi furono raccolti coll'intervallo di 10 min. per la prima ora e di 20 min. per le due ore successive. Il giorno dopo, cioè 14 ore dopo che questi saggi di sangue erano stati raccolti, erano ancora liquidi e coll'aggiunta di una soluzione di amigdalina, tutti diedero sviluppo del caratteristico odore di mandorle amare, ciò che dimostrava che anche dopo 3 ore nel sangue vi si trovava del fermento inalterato.

Conosciuto con questi esperimenti che il detto fermento persisteva per lungo tempo almeno in parte inalterato nel circolo, ho fatto un altra serie di ricerche tanto con questo, quanto colla diastasi, affine di vedere se si potevano isolare o per meglio dire scoprire nel sangue per mezzo della bilancia dei corpi, i quali per le loro proprietà, ma specialmente per la loro solubilità, dimostrassero che appartenevano ai fermenti: e allo scopo ben inteso di vedere se questi persistevano per molto tempo nel sangue, ed infine se venivano eliminati oppure assimilati dagli elementi morfologici, oppure trasformati nelle normali globuline o serine del plasma.

A questo scopo e per risolvere la prima parte ho precipitato tutti gli albuminoidi del sangue con alcool in eccesso, lasciandoli per qualche tempo in contatto coll'alcool, affine di ottenere che le globuline e le serine fossero rese del tutto insolubili nell'acqua; il precipitato essicato e pesato veniva poscia ripetutamente lavato affine di asportarne tutta la quantità di materiale solubile, e siccome tutti i fermenti sono alla stessa guisa dei peptoni solubili nell'acqua dopo essere stati precipitati dall'alcool ed essicati, così intendevo di determinare anzitutto la quantità di materiali solubili, sia del sangue normale, che di quello che aveva subito l'azione della diastasi, poi volevo rilevare per quanto tempo questi materiali solubili restavano nel circolo e come venivano modificati: del resto il metodo ora esposto corrisponde a quello adoperato da Ales-

sandro Schmidt per isolare dal sangue il fermento fibrinogeno.

Le pesate fatte mi hanno fornito delle differenze fino a 0,6 % grammi in più di materiali solubili per il sangue che aveva subito l'iniezione di diastasi, ed inoltre ho osservato che man mano si allontanava dal momento dell'iniezione, la cifra delle sostanze solubili si abbassava e dopo un ora circa dall'iniezione, la cifra delle sostanze solubili uguagliava quella del sangue normale.

Riporto a questo scopo uno dei miei esperimenti:

Cane del peso di Kg. 4,500 digiuno da 24 ore. — Raccolgo dalla carotide un saggio di sangue che viene trattato coll'alcool per la determinazione degli albuminoidi; dopo pratico l'iniezione di 3 gr. di emulsina sciolti in 35 cc. di acqua salata; dopo mezz'ora raccolgo pure un altro saggio di sangue che viene pure trattato con alcool.

Ecco i valori ottenuti tanto dal sangue normale, quanto da quello che ha subìto l'azione del fermento:

(Albuminoidi % precipitati dall'alcool) Sangue normale	19,091
Differenza dopo la lavatura	19,062
Sangue dopo l'iniezione	18,620
Differenza dopo lavatura	18,201

La diminuzione generale degli albuminoidi nella seconda ricerca dipende fuor di dubbio dall'idremia prodotta dalla prima sottrazione sanguigna, ma chiaramente appare la diminuzione in peso del precipitato ottenuto coll'alcool del sangue che ha subìto l'azione del fermento dopo che fu praticata la lavatura. La differenza ottenuta è fuor di dubbio minore confrontata a quella che si sarebbe dovuto avere calcolando la proporzione per cento di fermento che si trovava nel sangue, la quale è di circa 0,80 %. Ma questo risultato starebbe appunto a dimostrare che detti fermenti vengono man mano trasformati, oppure sono assimilati, od altrimenti come tali scompaiono dal plasma.

Contemporaneamente a queste ricerche io ho voluto ancora studiare ed accertarmi se i detti fermenti, anzichè venire tra-

sformati, venivano eliminati, ed in due cani ed in due conigli ho ricercato l'emulsina, tanto nell'urina, quanto nella bile, ma i risultati ottenuti furono sempre negativi.

Riporto un esperimento:

Cane del peso di Kg. 4,500, inietto 2,50 gr. di emulsina — per la durata di 20 ore si raccoglie l'urina e la bile — non si ha la caratteristica reazione nè nell'una, nè nell'altra.

Provato dunque che questi fermenti lentamente si trasformano, che non vengono eliminati dai principali emuntorii, quali sono i reni ed il fegato, e che dopo qualche tempo più non si ritrovano nelle sostanze solubili del precipitato alcoolico del plasma, resta a domandarsi anzitutto se vengono assimilati dagli elementi morfologici in particolare del sangue, oppure se si trasformano in qualcuno dei componenti del plasma.

In questo indirizzo il Fano (1) ha fatto interessanti ricerche nel suo studio che tratta del modo d'agire dei peptoni sul sangue e sulle modificazioni che questi subiscono nel circolo, e colla guida di questi io ho pure praticate alcune ricerche, anzitutto per conoscere se i detti fermenti si trasformano negli albuminoidi del plasma sanguigno, cioè nelle globuline o serine, oppure se questi fermenti vengano assimilati dagli elementi morfologici del sangue.

I risultati da me ottenuti in alcuni punti si concordano con quelli ottenuti dal Fano, ed io pure ricercando le variazioni del peso del cruore notai che negli animali assoggettati all'iniezione di fermento si aveva costantemente un aumento in peso del cruore stesso.

Gli animali per questi esperimenti erano sempre tenuti digiuni per 24 ore; il sangue estratto prima e dopo l'iniezione era sempre trattato cogli stessi procedimenti.

---

(1) Fano, « Il Peptone e il Triptone nel sangue e nella linfa ». (*Arch. per le Scienze Mediche*, Vol. V, N. 8).

Idem. « Di una nuova funzione dei corpuscoli rossi del sangue ». (Dallo *Sperimentale*, Settembre-Ottobre, 1882).

Tralascio di descrivere minutamente il metodo seguìto, giacchè ho adoperato metodi già conosciuti oggidì, tenendomi strettamente alle prescrizioni stabilite, senza introdurre alcuna ulteriore variazione, ed alcuni di questi processi sono esposti anche nel lavoro del prof. Fano.

Quando si parla di peso degli albuminoidi del sangue s'intende cumulativamente quello di tutti gli albuminoidi coagulabili, cioè la serina, la paraglobulina, la fibrina del plasma, l'emoglobina e le globuline degli elementi morfologici del sangue, é per ottenere questa coagulazione occorre l'aggiunta di qualche goccia di acido acetico per neutralizzare l'alcalinità del sangue. Ebbene ho osservato che nel sangue diastasiato occorre una quantità minore di quello che si domanda pel sangue normale, il che accennerebbe ad una strana modificazione nel valore dell'alcalinità del sangue.

Unisco alcuni dei risultati ottenuti dai miei esperimenti.

In un cane robusto, mai operato, del peso di Kg. 11, si inietta nella giugulare gr. 4,50 di diastasi vegetale sciolta in 45 cc. di soluzione salina. Prima e dopo l'iniezione si raccolgono le prove necessarie per la determinazione degli albuminoidi.

Ecco i valori ottenuti:

Sangue normale	22,43
Siero normale	6,06
Cruore normale	16,37
Sangue con diastasi	22,35
Plasma	4,81
Cruore con diastasi	17,54

Questi risultati dimostrano chiaramente che il peso del cruore aumenta e che questo aumento è dovuto ad albuminoidi coagulabili al calore.

Però, benchè questo risultato io l'abbia ottenuto diverse volte, anzi benchè varie volte io abbia notato che l'aumento in peso che subisce il cruore si presenti maggiore, tutto calcolato, della quantità di fermento che viene iniettato, pure dai risultati ottenuti da altro ordine di ricerche, mi pare di non potere addivenire a definite conclusioni, vale a dire asserire che

l'aumento in peso anche in questi casi, come pel peptone, dipenda dagli elementi morfologici del sangue i quali si sono incorporate queste sostanze o i prodotti delle loro trasformazioni, poichè mantenendo il sangue incoagulabile con altri mezzi e in altre condizioni, come ad es., col solfato di magnesia, io ebbi per risultato uguale aumento in peso del cruore.

Così in un cane del peso di Kg. 10 si estraggono varii saggi di sangue, uno dei quali viene trattato con una soluzione satura di solfato di magnesia.

Ecco i valori ottenuti, cioè la quantità degli albuminoidi prima e dopo il trattamento con detto sale.

Sangue normale	21,66
Siero normale	6,44
Cruore normale	15,22
Sangue magnesiaco	21,42
Plasma magnesiaco	5,25
Cruore magnesiaco	16,17

Questo aumento di peso del cruore magnesiaco resta ben difficile a spiegarsi ed è ben difficile poter trovare una correlazione coi risultati ottenuti colla diastasi, a meno che si ammetta che il solfato di magnesia aumentando i processi di ricambio fra i corpuscoli ed il plasma non portasse per conseguenza un aumento negli albuminoidi dei primi a detrimento di quelli del secondo. La costanza delle cifre ottenute d'altra parte mi fa escludere che l'aumento di peso dipenda dal solfato di magnesia, il quale si può sospettare che con facilità resti inglobato nella coagulazione in massa delle sostanze albuminoidi, e del resto, se questo fatto avvenisse, dovrebbe aumentare il valore di tutto il sangue dopo il trattamento con detto sale.

Anche nei conigli, sebbene coi fermenti non si ottengano effetti così palesi sulla coagulazione, nullameno le esperienze praticate a questo scopo mi hanno fornito gli stessi risultati, cioè si è avuto un aumento in peso del cruore dopo l'introduzione del fermento.

Riguardo al peso specifico dei corpuscoli rossi del sangue ho fatto alcune ricerche col metodo del Fano, sciogliendo pure la gomma in una soluzione salina al 0,75 %, ed ho osservato che in generale il peso specifico dei corpuscoli rossi del sangue è leggermente aumentato, così, per citarne un caso, pel sangue normale si ebbe 1046, pel diastasiato 1048. Ho però ancora talvolta notato che nei saggi di sangue rimasti liquidi per l'azione della diastasi, sebbene si dovesse ritenere che per la quantità di liquido introdotto doveva esservi una leggera diluzione, anzichè un addensamento del plasma, avveniva che lo strato di plasma che si formava nelle 24 ore era molto scarso, cioè i corpuscoli rossi andavano lentamente al fondo, cosicchè in questi casi non appariva al certo quell'aumento in peso dei corpuscoli, che talvolta avevo potuto osservare col metodo del Fano.

Le modificazioni che i fermenti esercitano sul sangue, oltre rassomigliarsi per i risultati fin qui ottenuti e fin ora esposti a quelli provocati dal peptone, hanno ancora queste altre consimili proprietà, cioè, il sangue diastasiato presenta alla stessa guisa del sangue peptonizzato, inibita ma non distrutta la sua proprietà di coagulare, in quanto che coll'aggiunta dell'acqua o con una corrente di acido carbonico si provoca formazione di fibrina.

Dalle esperienze predette appare pertanto che i fermenti lentamente si trasformano nel circolo, e che nelle loro lenti modificazioni producono dei cangiamenti nel sangue che noi obbiettivamente rileviamo colla perdita della sua coagulabilità; di più alcuni fatti rendono ammissibile che gli elementi morfologici possono essere quelli che prendono maggior parte a queste trasformazioni dei fermenti e questi fatti in appoggio sarebbero forniti dell'aumento in peso del cruore, dell'aumento del peso specifico dei corpuscoli rossi.

Ma venendo allo studio dei processi normali, possiamo noi dire che i fermenti di cui femmo parola esercitano un azione consimile anche nelle normali condizioni, contribuendo alla incoagulabilità del sangue circolante, ed anzi tutto abbiamo noi dati da ammettere che questi fermenti passino nel circolo. Se l'introduzione dei fermenti ha luogo nelle condizioni nor-

mali, come sembra risultare dalle ricerche fatte anche in questi ultimi tempi, al certo non è in alcun modo da paragonare questo colla artificiale introduzione che noi pratichiamo negli animali, la quale, se è spinta all'1 $^0/_{00}$ del peso del corpo, è causa costante di morte. Infatti chi ha una sol volta osservato l'azione del fermento diastasico, iniettato nella giugulare nella proporzione del 1 $^0/_{00}$ del peso del corpo, avrà osservato che il cane dopo poco l'iniezione si agita per poi divenire in breve tranquillo e come narcotizzato. La pressione sanguigna da 120 e 130, discende a 30 e 40, cosicchè il sangue sorte con difficoltà dall'arteria, e l'animale lasciato a sè, generalmente dopo poche ore muore. Alla sezione si osserva un arrossamento diffuso, con aspetto emorragico della mucosa intestinale dal piloro fino alla valvola ileo-cecale, nel crasso pure si nota questo arrossamento talvolta in grado anche più intenso: trassudato emorragico nell'intestino, emorragie puntiformi nell'endocardio, nei polmoni, congestione della milza del fegato e dei reni.

La diastasi pertanto, come chiaramente appare, quando è iniettata in una certa proporzione nel circolo, ed in ugual modo agiscono gli altri fermenti, ha l'effetto di una sostanza tossica che ha per sue proprietà anzitutto quella di impedire la coagulazione del sangue, poscia quella di produrre una paralisi dei vasi sanguigni specialmente intestinali. A questa paralisi vasale fa seguito la rilevante diminuzione della pressione arteriosa, e l'aumento sempre più marcato della tensione venosa, sempre più cospicua nel circolo addominale, al punto da formarsi dopo la congestione venosa, anche l'infarcimento emorragico della mucosa intestinale ed in seguito anche le emorragie degli altri visceri.

All'esame microscopico della mucosa intestinale, del fegato e dei reni, si conferma quanto macroscopicamente veniva rilevato, si osserva cioè che oltre all'enorme distensione dei vasi sanguigni venosi e dei capillari, ha avuto luogo una abbondante *diapedesin* dei corpuscoli rossi, in alcuni casi pronunciatissima.

Nel parenchima epatico la congestione sanguigna presentasi più rilevante che in tutti gli altri visceri, talchè questo presenta l'aspetto di quella speciale alterazione denominata atrofia cianotica, perchè appunto le cellule epatiche si presentano compresse e schiacciate dai distesi vasi capillari.

L'esito letale in alcuni casi si ottiene anche con piccole dosi, per es., con 0,41 ‰ del peso corporeo, però l'esito letale e la perdita della coagulabilità del sangue non sono due elementi che vadino di pari passo, giacchè in alcuni esperimenti ho ottenuto la perdita della coagulabilità con dosi di 0,20 ‰ del peso corporeo, e l'animale non solo sopravvisse, ma non presentò alcun disturbo apprezzabile, nè immediato, nè consecutivo all'iniezione.

In tutte le ricerche finora esposte, i fermenti furono iniettati nel circolo per la vena giugulare, ma non ho trascurato di sperimentare se questi fermenti per altre vie introdotti venivano assorbiti e toglievano in egual modo al sangue la sua coagulabilità e così ho praticato iniezioni sotto la cute, nel cavo addominale ed in tratti d'intestino isolati.

Ecco alcuni dei risultati ottenuti:

Ad un cane di Kg. 6 si iniettano sotto la cute 2 grammi di diastasi vegetale sciolta in 25 cc. di soluzione salina, corrispondente alla proporzione di 0,35 ‰ del peso del corpo; si pratica un po' di massaggio per favorire l'assorbimento, il quale però dovette essere molto lento, poichè dopo 3 ore dall'iniezione si osservano ancora le bozze benchè ridotte, prodotte dal liquido iniettato. I saggi di sangue raccolti per 5 ore, con intervallo di mezz'ora uno dall'altro, si mantennero liquidi e tali lo erano anche al giorno successivo.

Questo esperimento oltre dimostrare che la detta sostanza arriva nel circolo attiva, capace quindi di impedire la coagulazione, dimostra ancora che il lento riassorbimento aveva per risultato di rendere il sangue incoagulabile per un tempo ancora più lungo, mentre con il peptone, Fano ha trovato che la successiva e lenta introduzione resta senza effetto, così che su questo punto l'azione dei fermenti sarebbe diversa da

quella del peptone: però voglio aggiungere che non costantemente mi corrispose questo risultato.

In un cane del peso di Kg. 6, si isola 20 cm. di ansa intestinale dei tenui e si introducono 5 gr. di diastasi vegetale in soluzione salina; di mezz'ora in mezz'ora per cinque ore di seguito si estraggono dei saggi di sangue, i quali però tutti coagularono, come i saggi di confronto presi prima; dopo 6 ore l'ansa intestinale venne aperta e si constatò che il liquido era stato quasi tutto riassorbito.

In un altro cane anzichè la diastasi fu introdotta nell'ansa l'emulsina, ma anche con questa, benchè avvenisse il riassorbimento, il sangue coagulò egualmente ed inoltre non si potè mai constatarne la presenza nel sangue.

Se per il tubo enterico ha luogo, come risulta, il completo riassorbimento e nullameno appare la sua mancata azione sul sangue, ciò indurrebbe ad ammettere che questi fermenti nel tubo intestinale o nel loro passaggio nel sangue attraverso l'intestino subiscono dei cangiamenti alla stessa guisa di quelli che presentano i peptoni, come è stato dimostrato dal Salvioli (1). Molto probabilmente si può ammettere che una parte passi nel circolo, ma questa è in proporzione così piccola che non vi esercita alcuna palese azione sulla coagulazione.

La cognizione che i detti fermenti, ma specialmente i diastasici, hanno la proprietà di rendere il sangue incoagulabile, ha richiamato la mia attenzione su alcuni esperimenti già da molto tempo istituiti da Claude Bernard (2), coi quali egli veniva alla conclusione che una grande quantità di corpi oltre il fermento diastasico, avevano la proprietà di trasformare l'amido in zucchero, e su questo indirizzo io ho voluto sperimentare se la parete dei vasi sanguigni aveva appunto una proprietà saccarificante ed ho avuto appunto dei risultati i quali mi hanno nel modo più palese dimostrata questa proprietà.

---

(1) Salvioli, *Du Bois' Archiv*, 1880, Supp. S. 112.
(2) Bernard, « Leçons de Physiologie expérimentale ».

Gli esperimenti li ho eseguiti facendo circolare pei vasi sanguigni di una gamba di cane, accuratamente lavati con una soluzione indifferente di cloruro sodico, una soluzione di colla d'amido. Questa man mano col tempo si trasformava in zucchero.

A questi esperimenti al certo annetto un valore molto subordinato, mi pare però che da questi si potrebbe indurne una cognizione più concreta sulla misteriosa azione delle pareti vasali sul sangue, vale a dire dai miei esperimenti si potrebbe ammettere che l'impedita coagulazione nei vasi integri dipende dalla proprietà che hanno questi di fornire una sostanza la quale ha un'azione saccarificante alla stessa guisa della diastasi.

Io non voglio qua ripetere in che cosa consistono tutte quelle modificazioni che si presentano nel sangue diastasiato o assoggettato all'azione degli altri fermenti, sia nel circolo che fuori, poichè sono uguali in gran parte a quelle descritte dal Fano pei peptoni e dal Salvioli pei fermenti diastatici. Come si sa, non avvenendo la coagulazione, i globuli rossi precipitano al fondo del vaso più o meno rapidamente, sopra di essi s'accumulano i corpuscoli bianchi e le piastrine, formando uno strato o un cumulo, il quale, esaminato al microscopio, si mostra appunto costituito di globuli bianchi e piastrine generalmente ben conservate, ma talvolta però si trovano anche dei filamenti di fibrina che da queste si partono.

Ma ciò che può interessare più di tutto si è che talvolta, come sopra diceva, si osserva il plasma colorato da emoglobina, fatto questo che dimostrerebbe che i detti fermenti danneggiano la costituzione dei corpuscoli rossi, talchè questi facilmente perdono l'emoglobina.

Per sperimentare la resistenza dei corpuscoli rossi prima e dopo l'iniezione di diastasi, io isolavo dei tratti di giugulare, che poscia asportavo pieni di sangue. Colle regole antisettiche li mettevo in tubetti di gelatina sterilizzata e li mantenevo alla temperatura di 38 gradi. Aperti i detti vasi a periodi diversi, cioè dopo 5, 10, 15 giorni, ho osservato che nei vasi

contenenti sangue diastasiato, i corpuscoli rossi avevano ceduto al plasma quasi tutta la loro emoglobina, cosicchè nei preparati freschi di detto sangue si vedevano sotto il microscopio formarsi i cristalli caratteristici dell'emoglobina.

Il reperto degi animali morti per causa dell'iniezione dei detti fermenti, come appare dalla descrizione sopradetta, ha al certo tutti i caratteri di una infezione molto rassomigliante alla setticemia, dipendente cioè dall'inguinamento di quei speciali schizomiceti, i quali oltre provocare una particolare dissoluzione del sangue, provocano molteplici emorragie nei diversi visceri. Al primo momento si potrebbe sospettare che avendo iniettato fermenti non sterilizzati, queste alterazioni potessero dipendere da altre cause che non fossero i fermenti propriamente detti, ma anche coi fermenti bolliti noi vedremo si ottengono gli analoghi risultati e le uguali alterazioni, cosicchè concludo che questi effetti dipendono esclusivamente dall'azione dei fermenti sui vasi e sul sangue e che si sviluppano colla massima rapidità. Fuor di dubbio per potere arrivare ad escludere maggiormente l'azione dei microparassiti sarebbero state necessarie delle culture, cosa che io non ho fatto. Molto probabilmente la somiglianza di questi reperti con quelli di alcune malattie infettive dipende dalla formazione anche in queste ultime di speciali sostanze, le quali hanno alla stessa guisa dei fermenti, la proprietà di rendere il sangue incoagulabile.

Nella esposizione di queste mie ricerche ho accennato che nei conigli tutti questi fermenti ed anche la diastasi più attiva non esercitano alcuna azione, cioè non impediscono la coagulazione del sangue. Però esaminando attentamente, si osserva che anche in questi animali l'iniezione dei fermenti modifica la coagulazione, cioè si nota che il coagulo non si forma normalmente e la principale differenza consiste nella mancata retrazione della fibrina, per cui poco o nulla di siero viene spremuto dal coagulo.

Però a queste lievi modificazioni nella modalità della coagulazione altre molto più importanti se ne debbono aggiun-

gere, poichè nel coagulo che ha subìto l'azione della diastasi mancano delle proprietà, fanno difetto delle attività che esistono in quei coaguli, i quali non hanno subìto l'azione del fermento, cioè mentre il primo è privo di fermento fibrinoso, l'altro lo contiene.

Riporto uno fra i molti esperimenti praticati a questo proposito e che mi furono concordi nel risultato.

Coniglio del peso di Kg. 1,900 — estraggo 20 cc. di sangue e lo lascio coagulare, dopo spremo il coagulo appena formatosi ed inietto il sangue spremuto nella giugulare dello stesso coniglio, il quale muore istantaneamente, ed alla sezione osservo che le cavità destre del cuore sono piene di coaguli, perchè appunto abbiamo introdotto nel circolo del fermento, il quale ha prodotto la coagulazione del sangue circolante.

Se questa stessa esperienza si pratica con un coniglio assoggettato all'azione della diastasi e con sangue diastasiato, si ha un risultato del tutto opposto, cioè l'animale vive.

Coniglio del peso di Kg. 2,500 — si estraggono 20 cc. di sangue, poscia si inietta nella giugulare un grammo di diastasi bollita sciolta in 20 cc. di soluzione salina; dopo 20 minuti si estraggono altri 20 cc. di sangue. Il coagulo formatosi da questo secondo saggio, viene spremuto ed iniettato nella giugulare senza che ne segua alcun disturbo. Allora si spreme il coagulo del saggio di sangue normale e si inietta mezz'ora dopo l'ultima iniezione: l'animale muore rapidamente e presenta nel cuore destro coaguli come nel precedente esperimento.

Da queste ricerche quindi appare che anche nei conigli la diastasi ha un'influenza marcata sulla coagulazione, la quale forse non è così manifesta sul sangue estratto, perchè forse gli elementi morfologici di questi animali più facilmente si disfanno e meglio favoriscono i processi di coagulazione.

Però fuor di dubbio appare che essi neutralizzano od impediscono la formazione in eccesso di fermento fibrinoso, perchè forse impediscono una maggiore distruzione di elementi morfologici e per le dette ragioni ne viene un' interpretazione degli esperimenti ora descritti, tanto più che con altre ricerche ho potuto eliminare la presenza del fermento fibrinoso nei

coaguli ottenuti dal sangue diastasiato di coniglio, in quanto che il sangue spremuto da questi coaguli non produceva mai la coagulazione nei liquidi proplastici, mentre si sa la producono i coaguli normali, per la grande quantità di fermento libero che contengono.

A togliere però all'insieme dei fatti sopra esposti la schematica corrispondenza che li collega, contribuiscono le esperienze che ora esporrò e che mi furono destate dal desiderio di meglio approfondire l'argomento che avevo in esame.

A tutta prima io attribuiva ai fermenti un'azione tutta speciale, cioè ritenevo che la loro attività sul sangue, ed in ispecie sulla coagulazione, dipendesse dalla loro proprietà fermentativa, cioè fosse conseguenza della capacità che hanno queste sostanze di modificare la costituzione mollecolare di alcuni corpi; ma questa mia opinione non ha ottenuto l'appoggio sperimentale, cioè, non è stata confermata da una serie di ricerche fatte colle stesse sostanze private della loro facoltà fermentativa.

È una cosa conosciuta che questi fermenti quando vengono portati all'ebollizione e vi vengono mantenuti per qualche tempo, perdono completamente la loro proprietà fermentativa. Ripetendo io pure coi miei fermenti ho notato che nelle soluzioni assoggettate alla bollitura generalmente si formava un precipitato formato di sostanze albuminoidi coagulabili che inguinavano il fermento. La mia diastasi vegetale, ad es., dopo bollita non aveva più alcuna azione saccarificante, mentre presentava ancora le reazioni caratteristiche proprie dei fermenti; ed iniettata nel circolo nelle stesse proporzioni della diastasi attiva saccarificante, toglieva in egual modo al sangue la sua coagulabilità, e direi quasi che i saggi di sangue ottenuti tanto colla diastasi attiva o saccarificante, quanto con quella bollita o non attiva restavano egualmente incoagulabili, cioè che val quanto dire che non sarebbe già la proprietà speciale della sostanza come fermento che toglie la coagulazione, ma forse questo dipenderebbe dalla costituzione, o per meglio dire dalla composizione della sostanza stessa.

E a questa opinione ho potuto dare un valore, in quanto che partendomi da questo punto di vista, io ho fatto esperimenti con alcune sostanze albuminoidi ed in special modo coi due albuminoidi del sangue, colle serine e colle globuline. Io ora non accenno che ad alcuni dei risultati ottenuti, poichè su di questo argomento intendo ritornare con un lavoro speciale, nel quale intendo illustrare l'azione dei detti albuminoidi presi da varii animali ed esperimentati sia sulla stessa specie, sia in specie diverse.

Finora ho potuto osservare che la paraglobina iniettata nel circolo in una proporzione circa uguale alla diastasi impedisce allo stesso modo la coagulazione del sangue. La paraglobulina che ha servito per le mie esperienze veniva preparata precipitandola da una soluzione acquosa di siero di sangue di bue o di cavallo con una corrente di acido carbonico, e mi sono servito specialmente di questo metodo perchè la paraglobulina ottenuta in questo modo è pura e priva affatto di fermento fibrinoso, il quale non manca mai di trovarsi in quella ottenuta col metodo di Hammarsten. Con quest'ultimo metodo inoltre, cioè col solfato di magnesia, è difficile ottenere la paraglobulina esente da questo sale. Il precipitato veniva raccolto su un filtro lavato con acqua stillata, poscia sciolto in una soluzione salina. Gli esperimenti furono fatti esclusivamente sui cani e costantemente colla paraglobulina preparata dal bue e dal cavallo. Ottenni dei saggi di sangue che rimasero liquidi e presentarono tutti quei caratteri soliti a presentarsi per l'azione dei fermenti.

Sono dispiacente di non potere fornire le cifre delle sostanze albuminoidi, perchè non potei condurre favorevolmente a termine quelle ricerche allora intraprese.

Sebbene abbia in questi esperimenti usato della paraglobulina di siero di bue nei cani, nullameno il risultato resta sempre importante, cioè che un albuminoide del sangue normale è capace di arrestare la coagulazione; e questo risultato fa alla sua volta pensare che le mentovate sostanze artificialmente preparate, quando sono nuovamente introdotte nel cir-

colo, nel periodo che precede per così dire la loro trasformazione, agiscono sul sangue togliendone la coagulabilità. I risultati invece ottenuti iniettando nel circolo albumina d'ovo furono ben diversi; i saggi cioè di sangue estratti dopo l'iniezione si coagularono come i precedenti, cosicchè questa proprietà di rendere il sangue incoagulabile non sarebbe comune a tutte le sostanze albuminoidi, ma l'avrebbero solo quelle che sono più assimilabili, che hanno più tendenza all'organizzazione, che appartennero ad elementi morfologici viventi. Infatti noi sappiamo che l'albumina d'ovo iniettata nel circolo, passa costantemente nelle urine, mentre i peptoni, i fermenti e le globuline non vengono eliminati, ma trasformati ed assimilati.

Fino dal principio di questo mio studio, io rilevavo l'importanza dell'indagine chimica, affine di addivenire a più sicure conclusioni riguardo all'azione di questi fermenti, ed ora tanto più ne rilevo l'importanza quando penso alle gravi questioni che oggidì si agitano riguardo alla composizione chimica dei fermenti e del fermento diastasico vegetale in particolare del quale mi sono servito per tante ricerche sulla coagulazione. Così mentre Low Brown e Heron sostengono la natura albuminoide del fermento diastasico, Cohnheim, Hüfner ed Hirschfeld (1) negano che questo fermento sia da ascriversi ai corpi albuminoidi, anzi quest'ultimo in un recente suo studio ritiene che il fermento diastasico possa essere spogliato in gran parte degli albuminoidi che lo inguinano, conservando la sua proprietà saccarificante, cosichè egli conclude che la diastasi sia un corpo che ha tutte le reazioni della gomma e le sue specifiche proprietà di cambiare l'amido in zucchero dipendono da un corpo il quale è costituito da una speciale modificazione mollecolare analoga alla gomma, il quale se viene allontanato porta con sè la soppressione della funzione amilolitica.

I fermenti che ho usati tutti avevano reazioni delle sostanze

(1) Hirschfeld, « Ueber die chemische Natur der vegetabilischen Diastase », *Pflüger's Archiv*, 39, B. S. 499.

albuminoidi, talvolta contenevano ancora albuminoidi coagulabili al calore, però con ripetute precipitazioni coll'alcool io ho ottenuto della diastasi sufficientemente pura ed egualmente attiva, mentre sono diverse qualità di gomma iniettate nel circolo senza azione sulla coagulazione del sangue.

Dall'insieme delle mie esperienze propenderei a ritenere che la perdita della coagulabilità del sangue dipenda appunto dalla natura delle dette sostanze, le quali godendo un grado elevato nell'assimilazione, vengono appunto alla stessa guisa del peptone incorporati dagli elementi morfologici del sangue. Cosicchè in ultima analisi l'azione dei fermenti si avvicinerebbe in gran parte all'azione dei peptoni. Inoltre voglio aggiungere che in queste ricerche chimiche riguardanti la purificazione dei fermenti si tratta di una cosa molto difficile, in quanto che si può dare che sieno corpi di una costituzione molto complessa.

Riassumendo in pochi capitoli questo mio lavoro, dirò che dalle mie esperienze risultano i seguenti fatti:

La proprietà di impedire la coagulazione del sangue non è esclusiva di alcuni fermenti animali, ma bensì questa la posseggono in grado più o meno elevato tutti i fermenti sia animali che vegetali.

La loro azione sul sangue non è dovuta ad una semplice mescolanza con esso, per quanto intima essa sia, ma abbisogna che essi siano portati in circolo ed elaborati; ed in appoggio di ciò sta il fatto che essi scompaiono, a differenza del peptone, lentamente e gradatamente dal circolo, come si può constatare con speciali reazioni ed anche colla bilancia, non venendo però eliminati per i speciali emuntorii, almeno come tali, mentre invece con molta probabilità essi vengono assimilati dagli elementi morfologici del sangue.

Questi fermenti se introdotti in una dose un po' forte oltre alla loro azione sul sangue, hanno un'azione sull'organismo in genere e specialmente sui vasi addominali, paralizzandoli e producendo in questo modo una forte diminuzione della pressione sanguigna arteriosa ed un aumento della venosa con tutti gli effetti che da questi fatti ne derivano.

Tutte le vie per cui i fermenti possono penetrare nel corpo non sono uguali, in quanto a mantenerli attivi. Così per la via sottocutanea i fermenti agiscono, benchè assorbiti, molto lentamente, e questo fatto prova anche che non è necessaria, come pel peptone, un'introduzione repentina di dette sostanze in circolo per avere i voluti effetti.

I fermenti invece, assorbiti dall'intestino, perdono la loro proprietà, venendo essi profondamente modificati, talchè non è possibile poterne dimostrare la loro presenza nel sangue colle solite reazioni.

Un fatto degno di nota si è che anche nei conigli, benchè non così palesemente come nei cani, i fermenti agiscono. Infatti il coagulo è meno compatto, non spreme siero, ed è privo, oppure ben poco ne contiene, di fermento fibrinoso.

I fermenti non agiscono per la loro proprietà fermentativa, ma bensì forse per la loro speciale costituzione chimica, giacchè i fermenti che hanno perduto detta loro qualità colla ebollizione, impediscono ugualmente la coagulazione.

Infine altri fatti, come l'azione inibente della paraglobulina sulla coagulazione del sangue, provano ancora più che questa loro azione dipende appunto dalla costituzione chimica e molecolare delle dette sostanze, le quali si trovano in un grado molto elevato nella scala delle sostanze assimilabili.

Il campo di indagini su questo argomento è ora, direi, ancor più aperto alle ricerche degli studiosi, poichè trovo che questo studio lascia in me stesso molte nuove vie alle ricerche, molte incognite da chiarire, cosicchè invece di fabbricare teoriche dai miei esperimenti, preferisco lasciarli tali, cioè come semplici contributi di fatti su questa questione.

Ringrazio il chiarissimo signor prof. Puglia, il quale mi onora della sua fiducia e mi ha aiutato nel corso di questo mio studio.

Modena, ottobre 1887.

0,025

0,25 1 cc.

~~0,0025~~ 0,0025 1 cc. in 100

0,00025 1 cc. in 10

0,00017 1 cc. in 20

0,25

— 0,025

0,00025